

ČOVJEK

(od stanice do organizma)

TERAPIJA TUMORA – STANIČNA SMRT

Marko Marjanović

Laboratorij za eksperimentalnu terapiju, Zavod za molekularnu medicinu



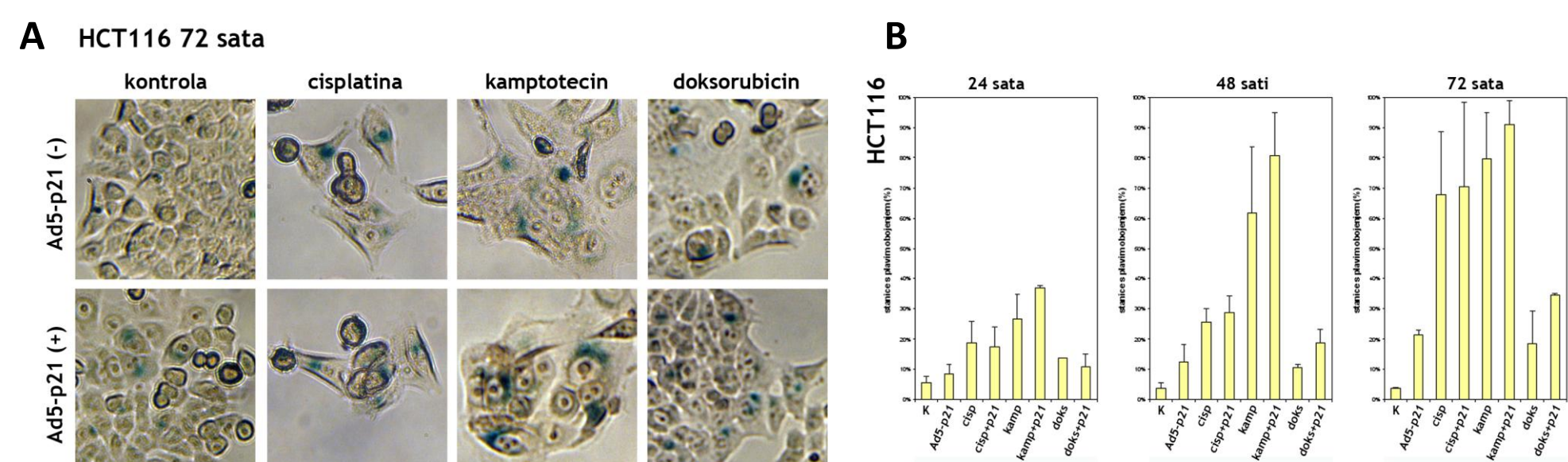
SAŽETAK

Najčešći uzrok malignih oboljenja je genetska nestabilnost izazvana nepravovremenim prepoznavanjem i popravkom oštećenja DNA koji nastaju zbog normalnih fizioloških procesa unutar stanice (umnažanje DNA, metabolizam...), te kao posljedica izlaganja vanjskim štetnim utjecajima (ionizirajuće zračenje, mutageni). S druge strane, izazivanje oštećenja u molekuli DNA putem zračenja ili kemoterapije predstavlja najčešći oblik terapije tumora i zbog toga je već dugi niz godina predmet intenzivnog proučavanja od strane znanstvene zajednice. Cilj svake terapije tumora jest selektivno izazivanje smrti stanica tumora, a oštećenja u DNA mogu uzrokovati zastoj staničnog ciklusa ili ukoliko je oštećenje preopsežno, mogu dovesti do raznih oblika stanične smrti kao što su apoptoza, nekroza, autofagija i stanično starenje.

TERAPIJA TUMORA

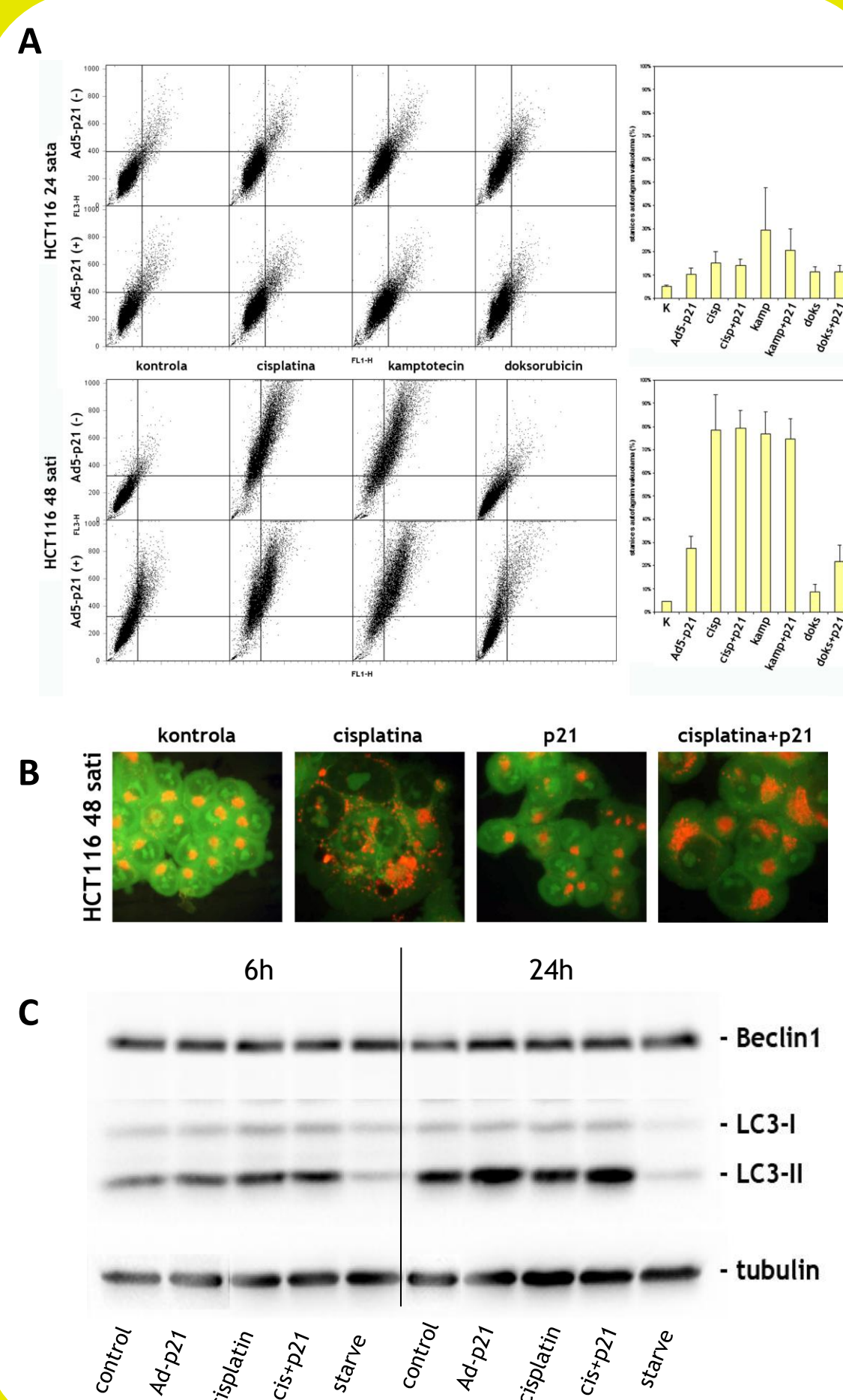
TIP TERAPIJE	PODTIP	NAČIN DJELOVANJA	PRIMJER
Kirurgija		Kirurško odstranjivanje malignog tkiva	
Kemoterapija	Alkilirajući agensi	Kovalentno se vežu na funkcionalne skupine bioloških makromolekula (DNA, RNA, proteini...)	Cisplatin, klorambucil...
	Antimetaboliti	Sprječavaju sintezu nukleinskih kiselina, onemogućavaju umnažanje DNA	Analozi baza (5-FU, merkaptopurin...)
	Biljni alkaloidi i terpenoidi	Sprječavaju funkcioniranje mikrotubula i razdvajanje kromosoma u mitozu, vežu se na DNA i onemogućuju njeno umnažanje	Vinkristin, etopozid, paklitaksel...
	Inhibitori topoizomeraza	Sprječavaju odmotavanje DNA potrebno za umnažanje DNA i prepisivanje gena	Kamptotecin, etopozid...
	Citotoksični antibiotici	Vežanje na DNA, stvaranje reaktivnih kisikovih radikala, inhibicija staničnih enzima...	Doksorubicin, bleomicin...
Zračenje	Zračenje vanjskim izvorom	Zrači se cijeli organizam ili samo dio, dolazi do lomova u DNA što negativno utječe na stanice koje se dijele	Linearni akcelerator, X-zrake, gamma nož...
	Brahiterapija	Izvor zračenja se postavlja u blizinu malignog tkiva	MammoSite, TheraSeed...
	Terapija radioizotopima	Specifičnim radioizotopima se cilja na pojedini organ	Jod, itrij
Molekularno/ciljano liječenje	Hormonska terapija	Inhibitori sinteza hormona, antagonisti hormonskih receptora...	Tamoksifen...
	Monoklonalna antitijela	Specifično označavanje pojedinog tipa stanica i prezentacija istih imunološkom sustavu	Rituksimab, Trastuzumab

STANIČNO STARENJE



Slika Bojanje stanica HCT116 na endogenu β -galaktozidaznu aktivnost. Stanice su tretirane s IC_{50} koncentracijama kemoterapeutika, s Ad5-p21 60 MOI i u kombinaciji. A) Primjer fotografija stanica bojanih na endogenu β -galaktozidaznu aktivnost B) Postotak stanica pozitivnih na endogenu β -galaktozidaznu aktivnost prebrojan je pod mikroskopom (minima-lno 200 stanica je brojano po uzorku), a predstavlja srednju vrijednost 3 neovisna pokusa.

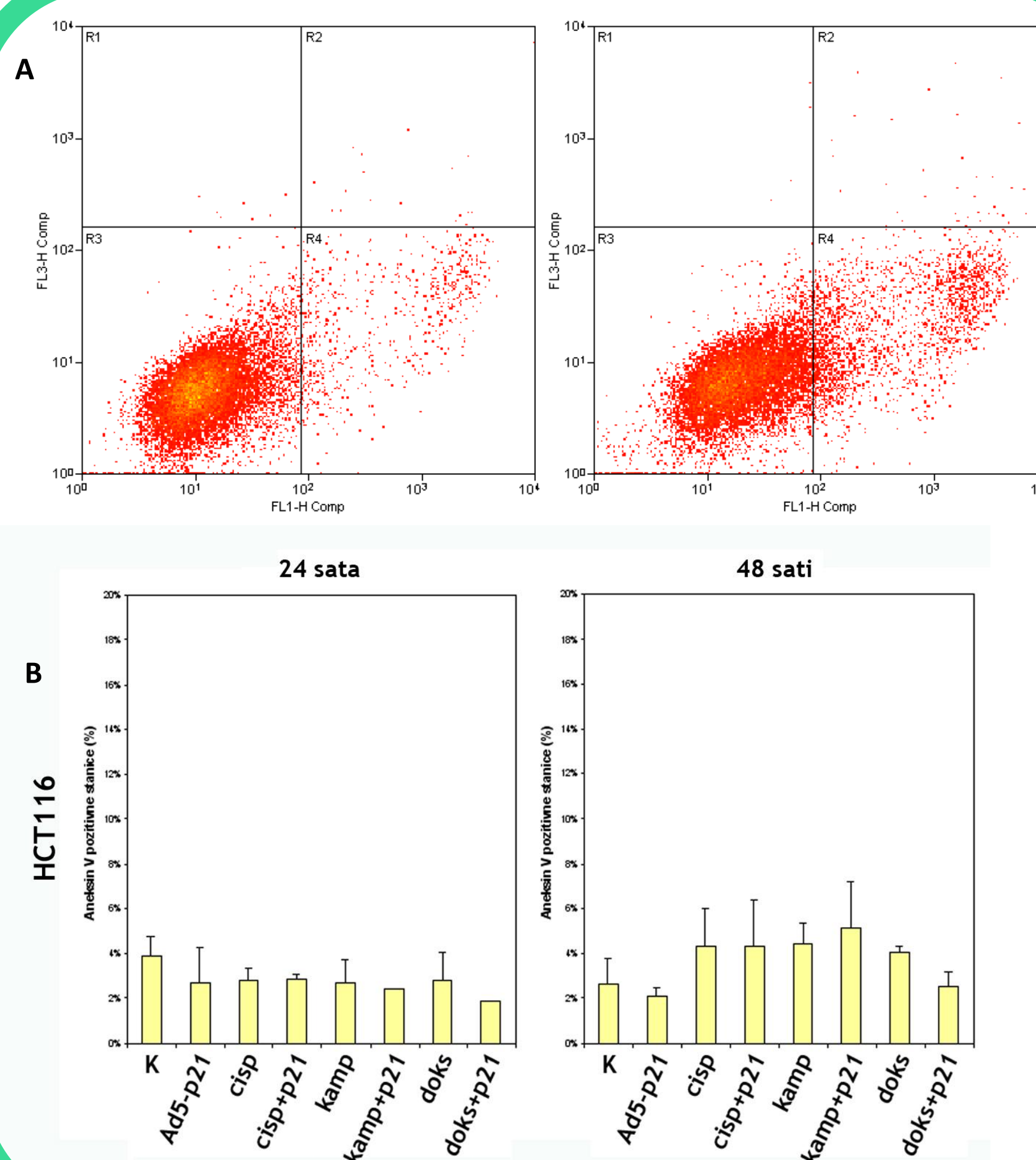
AUTOFAGIJA



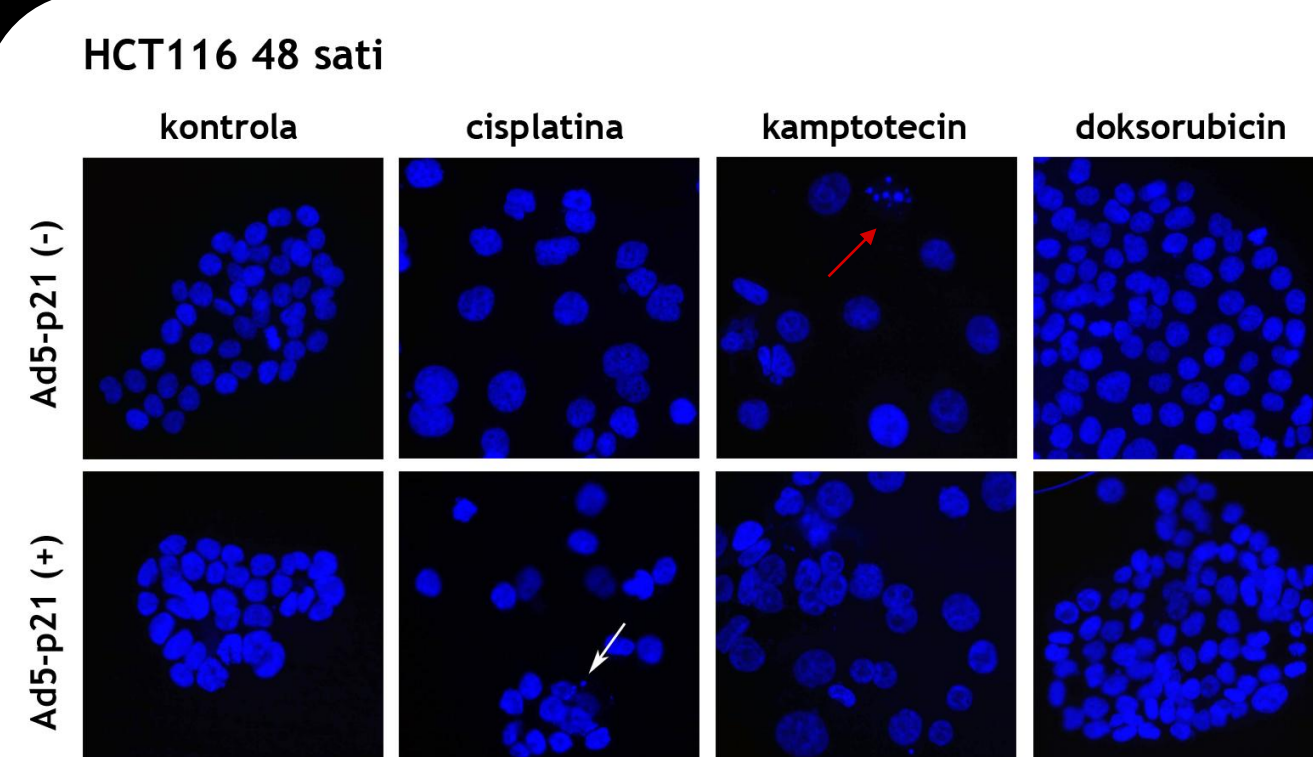
Slika A) i B) Bojanje stanica HCT116 sa akridin-oraž. Stanice su tretirane s IC_{50} koncentracijama kemoterapeutika, s Ad5-p21 60 MOI i u kombinaciji. Pod A) su prikazani grafikoni dobiveni dvoparametrijskom analizom na protočnom citometru (prikazan je jedan reprezentativni pokus), FL1-H zelena fluorescencija; FL3-H crvena fluorescencija. S desne strane je prikaz analiziranih dvoparametarskih grafikona, postotak stanica u gornja dva kvadranta, a predstavlja srednju vrijednost 3 neovisna pokusa. Pod B) je reprezentativni prikaz stanica HCT116 bojanih s akridin-oraž i fotografiran epifluorescencijskim mikroskopom. C) Analiza ekspresije dva markera autofagije (Beclin i LC) analizom po Westernu

RAZLIČITI OBLICI STANIČNE SMRTI

	NEKROZA	APOPTOZA	ANOIKIS	APOPTOZA NEOVISNA O KASPAZAMA	AUTOFAGIJA	WALERIJSKA DEGENERACIJA	POBUĐENA TOKSIČNOST	ERITROPOEZA	NASTANAK TROMBOCITA	OROŽNJAVANJE	NASTANAK LEĆE
Genetski program	Nema	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da	Da
Membrana	Lizirana	Neoštećena, izlaganje PS	Neoštećena, izlaganje PS	Neoštećena, izlaganje PS	Neoštećena, izlaganje PS	Neoštećena	Neoštećena	Neoštećena	Neoštećena	Neoštećena	
Organeli	Lizirani	Neoštećeni	Neoštećeni	Neoštećeni	Neoštećeni Reorganizacija lipida	Neoštećeni	Neoštećeni	Neoštećeni	Neoštećeni	Umreženi, reorganizacija lipida	
Mitohondrij i	Razbijeni	Neoštećeni	Neoštećeni					Gubitak		Gubitak	Gubitak
Jezgra		Kondenzacija kromatina, fragmentacija DNA	Kondenzacija kromatina, fragmentacija DNA	Kondenzacija kromatina, fragmentacija DNA	Kondenzacija kromatina, fragmentacija DNA			Gubitak	Gubitak	Gubitak	Gubitak
Enzimi	Nema	Kaspaze	Kaspaze	Kalpaini	Lizosomalni, beclin1	VPR	Kalpaini, NCX	Kalpaini		TG 1,3,5	TG
Receptori		Receptori smrt									
Regulatori		Bcl porodica, IAP					Nedostatak kalcija	GATA2		AP1, kalcij	



MITOTSKA KATASTROFA



Slika Jezgre stanica HCT116 bojene s DAPI nakon 48 sati inkubacije. Stanice su tretirane s IC_{50} koncentracijama kemoterapeutika, s Ad5-p21 60 MOI i u kombinaciji. Bijelom strelicom je označena stanica s mikronukleusom. Crvenom strelicom je označena stanica u apoptozi

Slika Vežanje aneksin V obilježenog s Alexa fluor 488 na kulturu stanica HCT116 tretiranih s IC_{50} koncentracijama kemoterapeutika, s Ad5-p21 60 MOI i u kombinaciji. B) Postotak aneksin V pozitivnih stanica je mjeran protočnim citometrom, a predstavlja srednju vrijednost 3 neovisna pokusa. Skala vrijednosti je skraćena do 20% zbog bolje razlučivosti. A) primjer točkastog grafikona dobivenog protočnom citometrijom

ZAHVALA

Ovo istraživanje je financiralo Ministarstvo znanosti, obrazovanja i športa kroz projekt *Uloga različitih mehanizama odgovora stanica na terapiju oštećenjem DNA* (098-0982464-2514) Voditeljica projekta i mentorica Dr. sc. Marijeta Kralj